

9  
(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-228012

(43)公開日 平成6年(1994)8月16日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/24	D	7433-4C		
9/127	F	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21)出願番号	特願平5-13119	(71)出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22)出願日	平成5年(1993)1月29日	(72)発明者	岩鶴 素治 東京都八王子市台町4-43 ローズハイツ 八王子 B-809
		(72)発明者	丸山 一雄 神奈川県津久井郡津久井町三ヶ木242-4
		(72)発明者	山内 仁史 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第 一製薬株式会社東京研究開発センター内
		(72)発明者	菊池 寛 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第 一製薬株式会社東京研究開発センター内

(54)【発明の名称】 リボソーム製剤

(57)【要約】

【目的】 細網内皮系組織に捕捉されにくいリボソーム製剤を提供する。

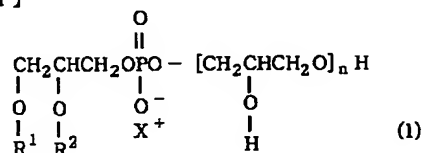
【構成】 ポリグリセリンリン脂質誘導体を含有するリボソーム製剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ポリグリセリンリン脂質誘導体またはその塩を含有することを特徴とするリポソーム製剤

【請求項2】ポリグリセリンリン脂質誘導体が式(1)

【化1】



で示される化合物またはその塩である請求項1記載のリポソーム製剤(式中、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ はそれぞれが水素原子または炭素数12乃至30の飽和脂肪酸残基もしくは不飽和脂肪酸残基を意味し、少なくとも一方は脂肪酸残基である。 $n$ は2~20の整数を意味する。 $\text{X}$ は水素原子またはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属原子を意味する。)

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はリポソーム製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】リポソーム製剤に代表される微粒子性薬物キャリアーを静脈内に投与すると、肝臓、脾臓などの細網内皮系組織(以下RESと略する)に捕捉されやすいことが知られている。このことは、薬物を封入した上記製剤を全身投与してRES以外の臓器へ積極的に送達するターゲティング型製剤、あるいは長時間にわたって血液中に滞留させ薬物の放出をコントロールする徐放型製剤等として利用するのに大きな障害となる。

【0003】従来から、上記製剤が微少循環性を有するような工夫はなされてきている。例えば、リポソーム製剤の脂質二分子膜の物理化学的性質が比較的容易に変えやすいことを利用して、サイズを小さくして血中濃度を高く維持させる例(バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、761巻、142頁、1983年)、相転移温度の高いレシチンを利用する例(バイオケミカル・ファーマコロジー、32巻、3381頁、1983年)、レシチンの代わりにスフィンゴミエリンを用いる例(バイオケミカル・ファーマコロジー、32巻、3381頁、1983年)、膜成分としてコレステロールを添加する例(バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、761巻、142頁、1983年)などがある。

【0004】更に近年リポソーム膜表面を糖脂質、糖タンパク質、アミノ酸脂質あるいはポリエチレングリコール脂質などで修飾し、微少循環性を付与するとともにRESを回避する研究が行われている。例えば、グリコ

一、223巻、42頁、1987年)、ホスファチジルイノシトール(FEBSレター、223巻、42頁、1987年)、グリコフォリンとガングリオシドGM3(特開昭63-221837号、1988年)、ポリエチレングリコール誘導体(FEBSレター、268巻、235頁、1990年)、グルクロン酸誘導体(ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレタン、38巻、1663頁、1990年)、グルタミン酸誘導体(バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、1108巻、257頁、1992年)などがその修飾物質として報告されている。ポリグリセリンリン脂質誘導体を静脈注射用脂肪乳剤の製造において乳化剤として用いる発明がある(特開平4-356417号公報)が、リポソームへの利用についての報告はない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】これらの修飾物質でリポソームを修飾した報告に関しては、そのリポソームを静脈内投与した場合でも、その効率および再現性の面、また修飾物質の量産化の面を考えると、必ずしもその目的が十分に達成されてない。さらに、ポリエチレングリコール誘導体については、モノクローナル抗体と共にこれではリポソーム膜表面を修飾した場合、ポリエチレングリコールがリポソーム表面を覆うことにより抗体の細胞認識能を阻害する報告(バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、1062巻、142頁、1991年)があり、ポリエチレングリコール誘導体をターゲティング型製剤へ応用するには難点があると言わざるを得ない。

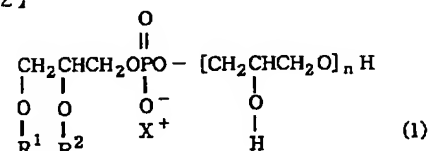
【0006】本発明者は、上記問題点を解決すべく鋭意検討した結果、本発明を完成した。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明はポリグリセリンリン脂質誘導体またはその塩を含有するリポソーム製剤に関する。更に詳しくは、本発明は式(1)で示されるポリグリセリンリン脂質誘導体またはその塩を含有するリポソーム製剤に関する。

【0008】

【化2】



【0009】(式中、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ はそれぞれが水素原子または炭素数12乃至30の飽和脂肪酸残基もしくは不飽和脂肪酸残基を意味し、少なくとも一方は脂肪酸残基である。 $n$ は2~20の整数を意味する。 $\text{X}$ は水素原子またはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属原子を意味する。)

【0010】本化合物の代表的な製造方法としては、酵素を利用したリン脂質の塩基交換反応において、ホス

アチジルコリンにホスホリパーゼDを作用させて目的とする塩基を持つリン脂質を製造する方法がある(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、232巻、477頁、1967年; バイオケミカル・ジャーナル、102巻、205頁、1967年)。

【0011】 $R^1$ および $R^2$ で示される脂肪酸残基すなわちアシル基としては、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペンタデカノイル、ヘキサデカノイル、ヘプタデカノイル、オクタデカノイル、ノナデカノイル、エイコサノイル、ヘニコサノイル、ドコサノイル、トリコサノイル、テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、トリアコンタノイル、4-ドデセノイル、9-ヘキサデセノイル、9-オクタデセノイル、11-エイコセノイル、13-ドコセノイル、15-テトラコセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、11,14-エイコサジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、11,14,17-エイコサトリエノイル、4,8,12,16-エイコサテトラエノイル、4,8,12,15,19-ドコサペンタノイル、2-デカニルヘキサデカノイル、2-テトラデシルヘキサデカノイル、2-テトラデシルヘキサデセノイル、2-テトラデセニルヘキサデカノイル等の直鎖もしくは分枝状の飽和脂肪酸由来及び不飽和脂肪酸由来のものがあげられる。

【0012】ポリグリセリンリン脂質誘導体を製造法により式(1)においてnの数が数種類の物が混ざったものとして得られることがあるが、更に精製することなくそのまま使用しても良い。

【0013】次に本発明のポリグリセリンリン脂質誘導体を含有するリポソーム製剤の製造法を説明する。

【0014】レシチン、スフィンゴミエリン及びジアシルホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質、糖脂質並びにジアルキル型合成界面活性剤等の膜形成物質を用いて公知の方法(アニュアル・レビュー・オブ・バイオフィジックス・アンド・バイオエンジニアリング、9巻、467頁、1980年)に従いリポソーム製剤の水分散液を調製する。

【0015】かかるリポソーム製剤の水分散液は、膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類を、荷電物質としてジアルキルホスフェート、ジアシルホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ステアリアルアミン等を、また酸化防止剤としてトコフェロール等を含んでいても良い。

【0016】上述の膜形成物質、膜安定化剤、荷電物質および酸化防止剤は脂質成分と総称することがある。

【0017】ポリグリセリンリン脂質誘導体は、上記の脂質成分と共に有機溶媒中に溶解した後、公知の方法に従いリポソーム製剤の水分散液を調製しても良いし、あらかじめ調製したリポソーム製剤の水分散液にポリグリセリンリン脂質誘導体の粉末または水溶液を加え一定時間放置、好ましくは膜の相転移温度以上に加温し、次の

で放冷することにより目的とするポリグリセリンリン脂質誘導体を含有するリポソーム製剤を製造することができる。

【0018】本発明のリポソーム製剤が、生体内で微小循環性を有し、肝臓、脾臓などの細網内皮系組織に捕捉されにくく、血中で薬物濃度を高く維持するためには、通常その製造工程においてポリグリセリンリン脂質誘導体の他の全脂質成分に対する割合を約0.1~20モル比、好ましくは1~10モル比にすることが望ましい。

【0019】本発明のリポソーム製剤が保持しうる薬物としては特に制限はないが、水溶性薬物および脂溶性薬物をあげることができる。中でも体内での代謝が速い薬物、尿中排泄が速い薬物など体内で有効に薬効を発現しにくいものが適当と考えられる。

【0020】具体例としては、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子(TNF)、上皮成長因子(EGF)、神経成長因子(NGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、心房性利尿ペプチド(ANP)、エリスロポエチン、インシュリン、ネオカルチノスタチン等の生理活性物質、プロスタグランジン、ステロイドなどのホルモン類、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、ドキソルビシン、アクリルビシン、4-O-テトラヒドロピラニルアドリアマイシン、4-エピアドリアマイシン、4-デメトキシダウノマイシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、メトトレキサート、カンプトテシンおよびその誘導体などの抗癌剤、アンピシリン、アモキシシリン、セファレキシン、セファクロル、ゲンタマイシン、シソマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、アミカシン、アムホテリシンB、ベンジルペニシリン、ペラシリン、セファロリジン、セファロチン、セファゾリン、セファマンドール、セフォタキム、セフォキシチン、セフメタゾール、セフォテタン等の抗生物質、スルフィソミジン、スルファジメトキシン、スルファモメトキシン、イソニアジド、ナリジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、エノキサシン、レボフロキサシン等の化学療法剤、イオヘキソール、イオジキサノール、インドシアニングリーン、イオタラム酸ナトリウム等の造影剤、トラネキサム酸、グルタチオン、アスピリン、プロブコール、マロチラート、チミペロン、ハロペリドール、ブクラデシンナトリウム、塩酸プロカインアミド、ビタミン類等の一般薬剤あるいはヘパリン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等が適当な薬物としてあげられる。

【0021】本発明のリポソーム製剤において、ポリグリセリンリン脂質誘導体はリポソーム製剤に疎水性相互作用を介して強固に組み込まれており、またモノマーとして遊離するのはほとんどないことをゲル濾過法にて確認した。

【0022】

【実施例】次に、本発明を実施例及び試験例により説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0023】使用したポリグリセリンリン脂質誘導体はジパルミトイルホスファチジルポリグリセリン (DPPPG、炭素数16、飽和) であり式(1)においてR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が共にヘキサデカノイル基であって、nの数によって次の様に略号で表す。

【0024】DPPPG-2 : n = 2

DPPPG-4 : n = 4

DPPPG-6 : n = 6

DPPPG-8 : n = 8

DPPPG-10 : n = 10

【0025】実施例1～実施例5：リポソーム製剤の調製

ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) 33.6 mg、コレステロール16.4mgおよびポリグリセリンリン脂質誘導体1.94mgをガラス製容器にとり、一旦エーテル

対照例1

実施例1 (DPPPG-2)

実施例2 (DPPPG-4)

実施例3 (DPPPG-6)

実施例4 (DPPPG-8)

実施例5 (DPPPG-10)

すなわち、ポリグリセリン誘導体を含むリポソーム製剤も、これを含むリポソーム製剤も同様に、サイズが100nm前後と均一なリポソーム製剤であった。

【0028】実施例6～実施例8

標識体として<sup>125</sup>I-チラミルイヌリンを用いたリポソーム製剤の調製

ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) 33.6 mg、コレステロール16.4mgおよびポリグリセリンリン脂質誘導体1.94mgをガラス製容器にとり、一旦エーテル・メタノール混液で完全に溶解させた後、これに<sup>125</sup>I-チラミルイヌリンを含む生理食塩水3mlを加え、超音波発振器にて乳化後、減圧下で有機溶媒を留去した。次に、ボルテックスミキサーにて攪拌後、リポソーム粗分散液を得た。このリポソーム粗分散液を凍結融解5回繰り返した後、孔径0.4 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを1枚、0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを2枚、合計3枚重ねて用いて、高圧下で押し出し濾過を10回繰り返した。リポソームに保持されなかった<sup>125</sup>I-チラミルイヌリンはゲル濾過クロマトグラフィ (バイオゲルA 1.5m、バイオゲル社製) によって除去し、<sup>125</sup>I-で標識されたリポソーム製剤を得

メタノール混液で完全に溶解させた後、これに生理食塩水3mlを加え、超音波発振器にて乳化後、減圧下で有機溶媒を留去した。次に、ボルテックスミキサーにて攪拌後、リポソーム粗分散液を得た。更にこのリポソーム粗分散液を孔径0.4 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを1枚、0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを2枚、計3枚重ねたものを用いて、高圧下で押し出し濾過を10回繰り返して行いポリグリセリンリン脂質誘導体を含むリポソーム製剤を得た。対照例1としてポリグリセリンリン脂質誘導体を含むしないリポソーム製剤を同様に製した。

【0026】試験例1：粒度分布測定

実施例1～5および対照例1で得たリポソーム製剤の粒子径を、準弾性光散乱法 (ダイナミック光散乱計 DEL-700、大塚電子社製) により求めた。得られた数平均粒子径 (nm±標準偏差) は次の通りである。

【0027】

92.9±3.1

102.9±2.9

121.9±2.9

122.4±2.9

97.8±3.0

115.9±2.9

た。対照例2としてポリグリセリンリン脂質誘導体を含むしないリポソーム製剤を同様に製した。各実施例で使用したポリグリセリンリン脂質誘導体は次の通りである。

【0029】実施例6：DPPPG-2

実施例7：DPPPG-4

実施例8：DPPPG-6

【0030】試験例2：体内動態実験

実施例6～8および対照例2のリポソーム製剤を、それぞれ ddY系雄性マウス (体重30～35g、3匹/群) の尾静脈に、脂質 (ジステアロイルホスファチジルコリンおよびコレステロールの合計) として0.5mgを投与した。3時間後麻酔下採血を行い、肝臓および脾臓を取りそれぞれ重量を測定した。次いでアロカ250ガンマカウンターで放射活性を測定し、投与全放射活性に対する各臓器の放射活性を百分率 (%) で表した。なお血中からの回収率 (%) はマウスの全血液量を体重の7.3 % として換算して計算した。

【0031】結果を表1および図1に示した。

【0032】

【表1】

## マウスにおける体内分布

	血 液	肝 臓	脾 臓
対 照 例 2	15.7 ± 0.4	30.8 ± 0.6	11.0 ± 1.2
実 施 例 6	22.4 ± 4.7	19.0 ± 2.5	6.4 ± 2.5
実 施 例 7	33.0 ± 4.2	15.3 ± 3.3	3.4 ± 0.4
実 施 例 8	30.1 ± 3.3	14.7 ± 1.5	4.4 ± 1.2

10

【0033】本発明のポリグリセリンリン脂質誘導体を用いて調製したリボソーム製剤は、血中濃度が高く維持された。また肝臓、脾臓への分布が抑制された。

実施例9～実施例13：<sup>67</sup>Ga- 標識リボソーム製剤の調製

標識体として<sup>67</sup>Ga- デフロキサミンを使用する他は実施例6～8と同様にしてリボソーム製剤を得た。対照例3としてポリグリセリンリン脂質誘導体を含有しないリボソーム製剤を同様にして製した。各実施例で使用したポリグリセリンリン脂質誘導体は次の通りである。

実施例9：DPPPG-2

実施例10：DPPPG-4

実施例11：DPPPG-6

実施例12：DPPPG-8

【0035】試験例3：体内動態実験

実施例9～12および対照例3で得たリボソーム製剤の体内動態を、実施例6～8と同様にして測定した。結果を表2および図2に示した。

【0036】

20 【表2】

【0034】対照例3： ナシ

## マウスにおける体内分布

	血 液	肝 臓	脾 臓
対 照 例 3	9.64 ± 3.00	64.0 ± 6.5	14.0 ± 2.0
実 施 例 9	37.00 ± 1.30	30.7 ± 4.0	15.9 ± 4.0
実 施 例 10	37.85 ± 5.50	31.6 ± 5.6	9.6 ± 2.1
実 施 例 11	48.30 ± 4.00	25.0 ± 3.0	8.2 ± 1.4
実 施 例 12	29.00 ± 2.80	36.8 ± 1.2	9.4 ± 1.0

【0037】本発明のリボソーム製剤は、血中濃度が高く維持された。また肝臓、脾臓への分布が抑制された。

【0038】試験例4：ビオチン-ホスファチジルエタノールアミンを含有するリボソーム製剤によるアビチンの凝集実験

ビオチンとアビチンは容易に結合することが知られている。リボソーム膜上にビオチンを露出させておけば、アビチンを加えた時にその結合を阻害するものが無ければビオチンとアビチンが結合する結果リボソームが凝集して濁度が増加することが知られている。

【0039】このとき凝集が起こらないのであれば、ビオチンとアビチンの結合が阻害されていることであり、リボソームの膜表面を、膜成分として特定の臓器に指向性を生じさせる物質で修飾した場合に標的臓器に指向性を生じさせにくいことを示す。

【0040】a) ビオチン-ホスファチジルエタノールアミンを含有するリボソーム製剤の調製

既知の方法（バイオミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、550巻、464頁、1979年）により、ビオチン-ホスファチジルエタノールアミンを合成した。このものの0.2 mgとジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）3.36mg、コレステロール1.64mgおよびポリグリセリンリン脂質誘導体0.194 mgをガラス製容器にとり、一旦エーテル-メタノール溶液で完全に溶解させたのち、これにリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）0.3 mlを加え、超音波発振器にて乳化後、減圧下で有機溶媒を留去した。次に、ボルテックスミキサーにて攪拌後、リボソーム粗分散液を得た。このリボソーム粗分散液を凍結融解5回繰り返した後、孔径0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを1枚、0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを2枚、合計3枚重ねて用い、高圧下で押し出し濾過を10回繰り返して行った。リボソームに保持されなかったビオチン-ホスファチジルエタノールアミンはゲル濾過クロマトグラフィー（バイオゲルA 1.

50

5m、バイオゲル社製)によって除去し、ビオチン-ホスファチジルエタノールアミンを含むリボソーム製剤を得た。

【0041】なお、対照例4はポリグリセリンリン脂質誘導体を用いないリボソーム製剤であり、対照例5および対照例6として、ポリグリセリンリン脂質誘導体に代えてポリエチレングリコールリン脂質誘導体PEG 1K(ポリエチレングリコールの分子量として約1000、リン脂質としてはホスファチジルエタノールアミン)またはPEG 2K(ポリエチレングリコールの分子量として約2000、リン脂質としてはホスファチジルエタノールアミン)を用いたリボソーム製剤を製した(FEBSレター、268巻、235頁、1990年参照)。各実施例で使用したポリグリセリンリン脂質誘導体またはポリエチレングリコールリン脂質誘導体は次の通りである。

【0042】実施例13: DPPPG-2

実施例14: DPPPG-4

実施例15: DPPPG-6

対照例4: ナシ

対照例5: PEG 1K

対照例6: PEG 2K

【0043】b) 濁度測定

実施例13~実施例15および対照例4~対照例6のリボソーム製剤0.1 mlに、PBS 0.65 mlを加え充分混合した後、PBSに溶解したストレプトアビチン(1 mg/ml)を0.01 ml添加し、波長440 nmにおける濁度を分光光度計で経時的に測定した。結果を図3に示した。

【0044】この結果から、対照例5、実施例13、14および15のリボソーム製剤の濁度は経時的に増大したが、対照例6および7のリボソーム製剤の濁度はほとんど増加しなかったことが認められる。とりわけ実施例13(DPPPG-2)および実施例14(DPPPG-4)では、対照例4とほぼ同等の濁度の増加を示した。また実施例15(DPPPG-6)においても実施例13や14ほど濁度の増加は認められなかったものの、対照例5および6に比べると約2倍の濁度の増加が認められた。

【0045】すなわち、ポリグリセリンリン脂質誘導体を含有した本発明のリボソーム製剤は、ポリグリセリンリン脂質誘導体を含有しない対照例4のリボソーム製剤に匹敵する濁度を示した、すなわちアビチンとビオチンの結合が阻害されてない。これより、RESを回避しつつ特定の臓器への標的化できることが示唆された。

【0046】ポリエチレングリコール誘導体を含有したリボソーム製剤では、リボソーム膜表面上に露出したポリエチレングリコール基がアビチンとビオチンの結合を阻害し、その結果リボソーム製剤は凝集せず濁度は増加しないことが知られている(バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、1062巻、142頁 1991年)。対照例5および対照例6についての試験結果からもこれが確かめられ、標的臓器に指向性を与えるのが困難であることを示している。

【0047】

【発明の効果】以上の実施例から明らかなように、本発明に係わるリボソーム製剤は、血中滞留性がよく、かつRESに取り込まれにくいという優れた特性を有している。また、再現性よく安価に大量生産することができ、実用上多くの利点をもたらすものといえる。また、RES以外の臓器に指向性を生じさせる物質、例えば、糖脂質、糖タンパク質、モノクローナル抗体、LDL、アミノ酸脂質などを用いるリボソーム製剤では、血中滞留性を維持しながらRES以外の臓器指向性を持たせることが困難であった。ところが、ポリグリセリンリン脂質誘導体を用いる本発明のリボソーム製剤では、RES以外の臓器に指向性を生じさせる物質を同時に用いてリボソーム製剤を製造しても、血中滞留性を維持しながら標的指向性を付与することが期待でき、本発明は極めて有用なリボソーム製剤を提供するものといえる。

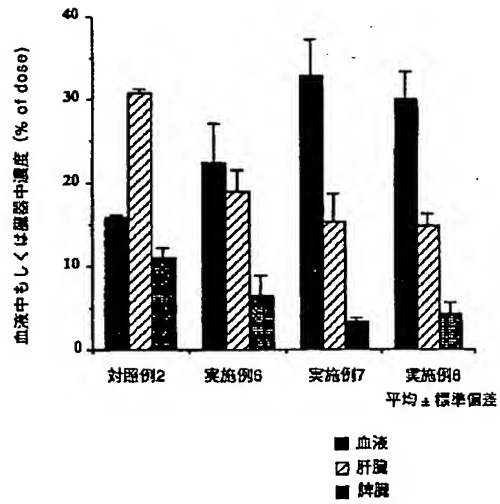
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のリボソーム製剤の体内分布である。

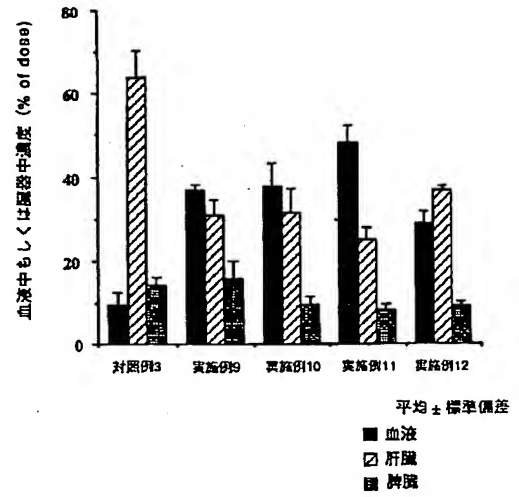
【図2】 本発明のリボソーム製剤の体内分布である。

【図3】 濁度の経時変化図である。

【図1】



【図2】



【図3】

